

Consideraciones sobre la interpretación de espectros de masas: sólo es cuestión de aplicar un par de reglas generales y matemáticas elementales

Juan J. Calvete

Laboratorio de Proteómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia. Email: jcalvete@ibv.csic.es

Resumen

La identidad de todo compuesto está definida en su estructura química. La espectrometría de masas es una potente herramienta para investigar la estructura de los compuestos químicos, incluidas la masa y la ordenación secuencial de sus elementos constituyentes. Sin embargo, los analizadores de masas solo pueden detectar iones. Las partículas neutras, sean moléculas o radicales, representan *materia oscura* para el analizador de masas y son eliminadas por el sistema de vacío del espectrómetro de masas. Los iones son partículas cargadas y, por tanto, su posición en el espacio puede ser manipulada mediante campos eléctricos y magnéticos. Conceptualmente, pues, un espectrómetro de masas puede considerarse un manipulador de iones. La interpretación del espectro de masas es la clave para la asignación estructural del correspondiente ión. Y, por complicado que pudiera parecer, interpretar espectros de masas es una cuestión sencilla: sólo se requiere aplicar rigurosamente unas pocas reglas generales derivadas de los procesos de ionización y fragmentación de los analitos y un nivel de cálculo de matemáticas elementales. De eso trata esta revisión.

1. Brevísima historia del nacimiento de la espectrometría de masas

Durante la última década del siglo XIX, el científico británico Joseph John Thomson (1856-1940) realizó una serie de experimentos con rayos catódicos que condujeron al descubrimiento del electrón [1]. Utilizando un tubo de rayos catódicos en alto vacío, Thomson demostró que los rayos podían deflectarse bajo la influencia de un campo magnético o eléctrico y que la carga negativa era una propiedad intrínseca de dichos rayos. En 1897, Thomson determinó que la relación m/z de los rayos catódicos era más de mil veces menor que la del ión H^+ (hoy sabemos que un protón es unas 1836 veces más masivo que un electrón), sugiriendo que se trataba de partículas muy pequeñas o altamente cargadas [1]. Esta revolucionaria conclusión implicaba que los rayos catódicos estaban constituidos por partículas subatómicas emitidas por los átomos del electrodo, a las que Thomson denominó “corpúsculos”, y que - por tanto- los átomos (del griego *ἄτομον*, *indivisible*) no eran las entidades elementales de la materia postuladas por la escuela atomista en la Antigua Grecia. Los

corpúsculos descubiertos por Thomson resultaron ser *electrones*, término acuñado en 1891 por el físico irlandés George Johnstone Stoney (1826-1911) para “la unidad fundamental de carga eléctrica”.

En 1913, en el marco de sus investigaciones sobre rayos anódicos, Thomson midió la influencia de campos eléctrico y magnético sobre un haz de neón ionizado, observando su descomposición en dos parábolas de deflexión. Thomson concluyó que el neón está compuesto por una mezcla de dos isótopos de masas atómicas 20 y 22. Esta observación representó la primera evidencia de la existencia de isótopos de un elemento estable. La separación de los isótopos del neón se considera el experimento que supuso el nacimiento de la espectrometría de masas, aunque la técnica, como método analítico capaz de determinar la composición isotópica de los elementos, fué posteriormente desarrollada por Arthur Jeffrey Dempster y Francis William Aston [2] entre 1918 y 1919. Thomson (Premio Nobel de Física de 1906), Dempster, y Aston (Premio Nobel de Química de 1922) son considerados los fundadores de la espectrometría de masas moderna [3].

2. Unidades de m/z y el defecto de masa atómica

Aunque resulte paradójico, los analizadores (espectrómetros) de masas no miden la masa sino la relación masa/carga (m/z) de compuestos ionizados, siendo “m” la masa molecular del compuesto y “z” un múltiplo de la carga elemental (e) del electrón. La relación m/z es adimensional al estar basada en la escala de Unidades Atómicas (UA) de Hartree (http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_unit) desde que en 1961 la IUPAC adoptó como unidad de masa atómica (uma) la doceava parte de la masa del ^{12}C , el isótopo natural más abundante del carbono, como base para asignar la masa atómica relativa de todos los demás elementos químicos. De acuerdo a esta convención, la masa de 1 átomo de ^{12}C es 12 uma. También por definición, la unidad de carga eléctrica, e, en la escala UA es exactamente igual a 1.

La denominación más frecuentemente utilizada para la unidad de masa atómica (uma) es el “Dalton” (Da), término acuñado en honor de John Dalton (1766-1844), químico y físico británico, quién en 1803 formuló la *Ley de las Proporciones Múltiples* que postula que los pesos de dos elementos siempre se combinan entre sí en proporciones de números enteros pequeños. En ese mismo año Dalton publicó su primera lista de pesos atómicos y símbolos, y en 1808 expuso la teoría atómica en la que se basa la física moderna. 1 Da se corresponde aproximadamente con la masa de un protón (o un átomo de Hidrógeno, ^1H). En honor del descubridor del electrón y fundador de la espectrometría de masas, Cooks y Rockwook propusieron en 1991 el Thomson (Th) como unidad de m/z [4]. 1 Th equivale a 1 Da/e y, por tanto, para iones monocargados, y sólo en este caso, la masa en Da de un ión coincide con su relación m/z.

1 gramo equivale a la masa 1 mol (N_A) de unidades de masa atómica. Así pues, un mol de átomos de ^{12}C tiene una masa de 12 g y, por tanto, el valor de 1 uma en unidades del SI se obtiene mediante la fórmula $12 \text{ g}/(12N_A) = 1/(6,02214199 \times 10^{23}) = 1,66053873 \times 10^{-27} \text{ kg}$. Un átomo de ^{12}C está formado por 6 protones, 6 neutrones y 6 electrones. Las masas experimentales en reposo del protón (m_p), neutrón (m_n) y electrón (m_e) son $1,67265 \times 10^{-27} \text{ kg}$ (1,0072935 u.m.a), $1,67495 \times 10^{-27} \text{ kg}$ (1,0086786 uma) y $9,10938215 \times 10^{-31} \text{ kg}$ (0,0005485799 uma), respectivamente. La masa atómica asignada al ^{12}C (m_{asig} , 12,0000) es menor que su masa atómica cal-

culada (m_{calc}) a partir de su composición subatómica, incluso tomando en consideración el efecto relativista de pérdida de masa debido a la energía ($E = mc^2$) liberada en la formación del núcleo atómico.

El defecto de masa (m_{def}) se calcula mediante la ecuación: $m_{\text{def}} = m_{\text{asig}} - m_{\text{calc}} = 12,0000 - (1,0072935 n_p + 1,0086786 n_n + 0,0005485799 n_e) = -0,0958$ uma, siendo n_p , n_n y n_e el número de protones, neutrones y electrones constituyentes del átomo. Por convención, en la escala de UA el defecto de masa del ^{12}C se cancela aproximando las masas del protón y del neutrón a 1 uma [5]. De esta manera la masa atómica del ^{12}C (12 uma) coincide con su número másico (6p + 6n). Las masas de todos los demás átomos calculadas en relación a la masa del ^{12}C se desvían, por exceso o defecto, de su número de nucleones. En el caso de los átomos más abundantes en las biomoléculas la desviación entre masa atómica y número másico es: ^{14}N , +0.00307 uma; ^{16}O , -0.00509 uma; ^1H , +0.007825 uma; ^{31}P , 0,02624 uma; ^{32}S , 0,02793 uma (Tabla). Aunque pequeñas, estas diferencias deben tenerse en cuenta a la hora de comparar masas experimentales determinadas por espectrometría de masas con valores teóricos calculados sumando las masas atómicas de los átomos constituyentes del ión. Además, la comparación entre masa experimental y teórica sólo tiene sentido si ambas magnitudes están expresadas en las mismas unidades, que en el caso que nos ocupa son unidades de masa atómica relativas a la del ^{12}C .

3. Iones quasimoleculares

El cálculo de la masa molecular de un compuesto a partir de su espectro de masas requiere también un entendimiento del proceso de ionización (¿resultó alterada la composición y/o la ordenación atómica del compuesto al ionizarse?), así como la determinación de la carga (z) del correspondiente ión. En el caso de moléculas biológicas, las técnicas de ionización más utilizadas son la electronebulización (electrospray, ESI) [6] y la desorción por radiación láser asistida por una matriz (MALDI, *matrix-assisted laser-desorption ionization*) [7,8]. ESI y MALDI se engloban en el conjunto de técnicas de ionización “suave” (*soft ionization*) caracterizados por producir iones de analitos intactos que no muestran una tendencia significativa a fragmentarse espontáneamente. Una descripción pormenorizada de los principios operacionales de estas técnicas excede los objetivos de este artículo. Baste mencionar aquí que tanto ESI como MALDI producen

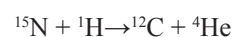
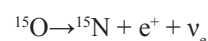
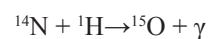
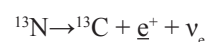
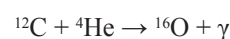
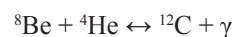
iones quasimoleculares $(M+nH)^{n+}$ y $(M-nH)^{n-}$ por captación o pérdida de protones [9]. La detección de iones quasimoleculares positivos o negativos está en función de la polaridad de medida del analizador de masa seleccionada por el operario, y el número de protones (nH^+) captados o cedidos por el analito depende tanto de la estructura del compuesto como de las condiciones de ionización empleado. La tendencia de un compuesto (Y) por generar iones protonados es proporcional a su basicidad relativa (ΔG_B) en la fase gaseosa, considerando la basicidad en el sentido empleado por Lewis-Brønsted, como una medida de la tendencia del ión a captar un protón. En el equilibrio $XH^+ + Y \rightleftharpoons X + YH^+$ (donde XH^+ representa un donante de protones, como es el solvente en ESI y la matriz en MALDI), $\Delta G_B = -RT \ln ([X][YH^+]/[Y][XH^+])$. Por tanto, las condiciones experimentales para producir iones protonados mediante ESI o MALDI deben ajustarse para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la derecha. MALDI tiende a producir iones monocargados mientras que ESI genera series de iones multicargados. Más adelante veremos como esta última circunstancia posibilita la determinación de la masa de macromoléculas en instrumentos cuyo rango de medida de m/z (< 4000) es muy inferior a la masa molecular del analito.

En experimentos con mezclas se observa frecuentemente el fenómeno de supresión de la ionización de compuestos de baja basicidad relativa por aquellos de más alta ΔG_B . Conviene recordar este hecho pues un espectro de masas refleja la intensidad relativa de los iones detectados, qué no tiene por qué equivaler a “la abundancia relativa de los compuestos en la muestra analizada”. En el caso de polipéptidos, los protones se adicionan a sitios de alta basicidad (grupos amino terminal, ϵ -amino de lisinas, guanidino de argininas, e imidazol de histidinas), o se liberan de grupos ácidos (aspártico, glutámico, grupo fenol de la tirosina, fosfórico, etc.), generándose, en ambos casos los iones quasimoleculares $M+H^+$ y $M-H^-$, respectivamente. La masa molecular (M) de estos iones puede calcularse a partir de las ecuaciones $M = [(m/z) \times z] - nm_H^+$ ó $M = [(m/z) \times z] + nm_H^+$, dependiendo de que la medida de m/z se haya realizado en modo positivo o negativo, respectivamente, y donde nm_H^+ es la masa de los protones captados o cedidos en la ionización. Pero no nos adelantemos, porque antes de pasar a describir cómo se deduce una masa molecular a partir de un espectro de masas debemos

hacernos la siguiente pregunta: ¿cada compuesto químico tiene una masa molecular única? En otras palabras, ¿cómo se calcula la masa molecular de un compuesto a partir de su fórmula química? La respuesta inmediata es “sumando las masas de todos los átomos de la estructura”, y ahí es donde reside el *quid* de la cuestión: ¿qué valores de masa atómica debemos considerar? Para responder a esta pregunta retrocedamos a los orígenes de la materia...

4. Isótopos y distribución de masa molecular

La nucleosíntesis ocurrió en los primeros tres minutos después del Big Bang cuando el Universo en expansión se hubo enfriado lo suficiente como para formar protones y neutrones estables [10,11]. La nucleosíntesis del Big Bang es responsable de las relaciones de abundancia de los elementos más ligeros que el Berilio, 1H , 2H , 3He , 4He , y 7Li . El resto de los elementos de la tabla periódica se sintetizaron posteriormente mediante procesos de nucleosíntesis estelar, mediante el ciclo del carbono-nitrógeno-oxígeno (CNO) propuesto en 1938 por Hans Bethe [12] y cuyas ecuaciones más básicas son:



Las reacciones de nucleosíntesis por fusión nuclear en estrellas de masa menor a 1.4 masas solares (límite de Chandrasekhar) sólo producen elementos hasta el ^{56}Fe , el núcleo atómico más estable; los elementos más pesados se producen por procesos de captura neutrónica en estrellas más masivas. Una consecuencia de la nucleosíntesis estelar es la existencia de isótopos. Nombrados a partir del griego *isos*, mismo, y *topos*, lugar, debido a que ocupan el mismo lugar en la Tabla Periódica de los

Elementos, los isótopos son átomos que tienen el mismo número atómico (número de protones en el núcleo), pero diferente número másico (suma del número de neutrones y el de protones en el núcleo). Difieren pues en el número de neutrones, por lo que los isótopos tienen el mismo número de electrones (y carga eléctrica) y, por tanto, difieren en masa pero poseen las mismas propiedades químicas.

Exceptuando los elementos radiactivos, la composición isotópica de los átomos que se encuentran en la naturaleza es esencialmente constante (al menos desde que sabemos como determinarla). La siguiente Tabla muestra los isótopos estables de los principales átomos que forman las estructuras covalentes de toda la materia biológica conocida [13]:

Elemento	Isótopo	Abundancia (%)	Masa atómica (uma)
Hidrógeno	¹ H	99,9885	1,007825
	² H	0,0115	2,014101
Carbono	¹² C	98,93	12,00000
	¹³ C	1,07	13,00335
Nitrógeno	¹⁴ N	99,632	14,00307
	¹⁵ N	0,368	15,00010
Oxígeno	¹⁶ O	99,757	15,99491
	¹⁷ O	0,038	16,99491
	¹⁸ O	0,205	17,99716
Fósforo	³¹ P	100	30,97376
Azufre	³² S	95,02	31,97207
	³³ S	0,75	32,97145
	³⁴ S	4,21	33,96786
	³⁶ S	0,02	35,96708

Las masas atómicas de los átomos de elementos di- o poliisotópicos de la Tabla Periódica (<http://tablaplus.awardspace.com/Tabla.html>) se calculan como la media ponderada de las masas de sus distintos isótopos teniendo en cuenta la abundancia relativa de cada uno de ellos. Consideremos el carbono como ejemplo. Este elemento consta de dos isótopos estables (Tabla): ¹²C (abundancia relativa, 98,93%) y ¹³C (1,07%). La suma ponderada de las masas de cada isótopo da: (0,9893 x 12,000) + (0,0107 x 13,0035) = 12,0107 uma.

La composición química de toda la materia de nuestro planeta refleja las relaciones de abundancia de los átomos de la nube primigenia de polvo y gas expulsada al espacio en explosiones de Supernova y que constituyó la materia prima a partir de la cual se formó el Sistema Solar. Ello implica que, por ejemplo, por término medio, de cada 100.000 átomos de carbono 1070 son ¹³C. Igualmente, existen, respectivamente, 11,5 átomos de ²H y 368 de ¹⁵N en cada 100.000 átomos de hidrógeno y nitrógeno. Esta circunstancia equivale a decir que las moléculas no poseen una masa molecular única sino una distribución de masas. En el caso de moléculas que, como las proteínas y otras macromoléculas biológicas, están constituidas por elementos cuyos isótopos más abundantes son los de menor masa atómica (Tabla), el primer pico (M) de la distribución isotópica corresponde al ión *monoisotópico*. Este ión es único en la distribución isotópica al ser una especie homogénea constituida por los isótopos, ¹H, ¹²C, ¹⁴N y ¹⁶O, ³²S, etc. Todos los demás picos corresponden a poblaciones heterogéneas de iones que contienen combinaciones de isótopos sucesivamente más pesados. Por ejemplo, el pico M+1 (segundo pico o pico del primer isótopo) corresponde a iones que contienen un ¹³C o un ¹⁵N o un ³³S etc. y, por tanto, aproximadamente una unidad de masa más que el monoisotópico; los iones M+2 (pico del segundo isótopo) poseen 2 ¹³C ó 2 ¹⁵N ó 1 ¹⁸O, ó (1 ¹³C + 1 ¹⁵N) ó (1 ¹³C + 1 ³³S, etc..) y son aproximadamente 2 unidades de masa atómica (uma) más pesados que M; y los iones M+3, ... M+n poseen, sucesivamente, masas que exceden desde ~ 3 hasta “n” uma a la masa del ión monoisotópico. Es importante insistir en el carácter aproximado de los cálculos anteriores, dado que la diferencia de masa entre isótopos consecutivos de diferentes átomos no es exactamente igual a 1 uma, ni siquiera es la misma para todos los átomos poliisotópicos: ¹³C - ¹²C = 1,00335 uma; ¹⁵N - ¹⁴N = 0,99703 uma; ²H - ¹H = 1,006276 uma, etc. (Tabla). De hecho, en analizadores de masa de muy alta resolución los picos M+1, M+2, etc. llegan a desdoblarse en los iones correspondientes a los isótopos de los diferentes átomos constituyentes¹.

¹ Por esta razón se utilizan las masas de iones monoisotópicos de péptidos tripticos para identificar proteínas mediante experimentos de huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*, PMF). La especificidad de este método, desarrollado en 1993 independientemente por varios grupos de investigación [16-20], depende críticamente de la exactitud de las masas utilizados para interrogar al banco de datos de referencia. El ión monoisotópico es la única especie cuya masa está perfectamente definida por su composición atómica y, por tanto, su medida conlleva

Una consecuencia de la disparidad de incrementos de masa entre los isótopos consecutivos de diferentes átomos es que compuestos de fórmulas empíricas diferentes también difieren en su masa exacta. En otras palabras: la masa, medida con suficiente exactitud, es una característica única y discriminadora de compuestos no isoméricos.

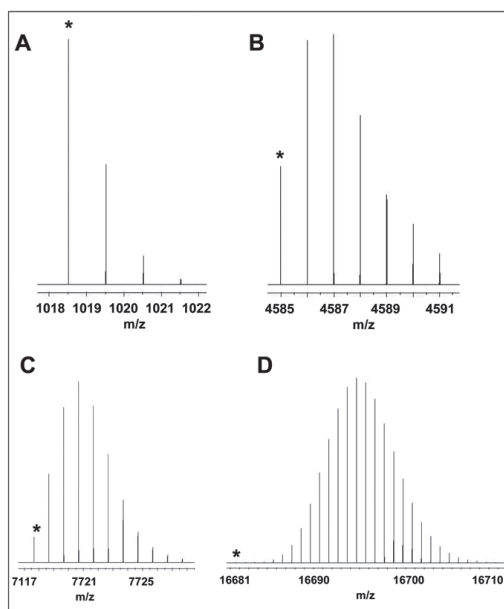


Figura 1. Simulación por deconvolución con ChemCalc (<http://www.chemcalc.org>) de las distribuciones isotópicas de (A) un nonapéptido (M_{mono} , 1018.5 Da) de fórmula empírica $C_{44}H_{70}N_{14}O_{12}S$, (B) un polipéptido de ~ 4.5 kDa de masa molecular y fórmula $C_{186}H_{293}N_{59}O_{61}S_8$, (C) una proteína de ~7 kDa ($C_{318}H_{502}N_{102}O_{119}S_{14}$) y (D) una proteína de masa molecular monoisotópica 16.681,6 Da y fórmula $C_{1253}H_{224}N_{42}O_{50}S$. Se aprecia claramente el corrimiento hacia la derecha de la intensidad relativa de los picos isotópicos a medida que aumenta la masa molecular. En A-D, el ión monoisotópico está señalado con un asterisco.

La abundancia relativa de los picos de la distribución isotópica de una molécula puede calcularse a partir de su fórmula química mediante el desarrollo en sumandos de un polinomio del tipo $(a_1 + a_2 + a_3 + \dots)^X (b_1 + b_2 + b_3 + \dots)^Y (c_1 + c_2 + c_3 + \dots)^Z \dots$, representando las series “ $n_1 + n_2 + n_3 + \dots$ ” la abundancia relativa de los isótopos del elemento “ n ” y los exponentes X, Y, Z, etc. el número de átomos del correspondiente elemento en la fórmula [14,15]. La distribución isotópica de un péptido sencillo como es el glucagón, de 29 residuos, cuya fórmula es $C_{153}H_{224}N_{42}O_{50}S$, contiene un enorme

número de términos: $(0,9889 + 0,0107)^{153} (0,999885 + 0,000115)^{224} (0,99632 + 0,00368)^{42} (0,99757 + 0,00038 + 0,00204)^{50} (0,9502 + 0,0075 + 0,0421 + 0,0002)$, que hace su cálculo inviable manualmente. Existen, no obstante, sencillos programas de ordenador para computar por deconvolución matemática la distribución isotópica teórica a partir de la fórmula empírica (ej. <http://www.chemcalc.org/>).

Es mucho más sencillo calcular la altura relativa de los picos isotópicos. Así, el cociente $(M+1)/M = \Sigma(\%I \times nE)/(100 - \%I)$, siendo %I la abundancia relativa del elemento E y nE el número de átomos de ese elemento en la molécula. Para el glucagón, la abundancia relativa del pico isotópico (M+1) respecto al ión monoisotópico es: $(1,07 \times 153)/0,9893 + (0,0115 \times 224)/0,999885 + (0,368 \times 42)/0,99632 + (0,038 \times 50)/0,99962 + (0,205 \times 50)/0,99795 + 0,75 = 196,49\%$. Puede demostrarse fácilmente que la abundancia relativa de los picos isotópicos se desplaza hacia la derecha a medida que aumenta la masa molecular del compuesto. Este punto queda ilustrado en la Fig. 1.

La distribución isotópica es una característica diferencial de cada molécula poliatómica compuesta por elementos poliisotópicos. Así, dos compuestos de igual masa molecular pero diferente fórmula química difieren en sus diagramas de distribución isotópica. Este hecho es ampliamente utilizado en Química Analítica como prueba de la correcta asignación estructural de un compuesto [9]. La determinación de la distribución isotópica es la única técnica apta para la detección de pequeñas alteraciones isotópicas en muestras geológicas y medioambientales, que pongan de manifiesto procesos naturales o antropogénicos sobre el entorno, con incertidumbres inferiores al 1‰. Asimismo, la manipulación de la distribución isotópica de una molécula mediante técnicas de marcaje isotópico ha permitido el desarrollo de métodos de comparación de la abundancia relativa de proteínas (ej. ICAT, iTRAQ, SILAC, etc.) con los que explorar la dinámica molecular del proteoma celular [21,22]. Estas metodologías son de gran relevancia para detectar cambios en la expresión de proteínas asociados a procesos fisiológicos o patológicos celulares. Además, el uso de trazadores isotópicos, enriquecidos en algún isótopo minoritario en la naturaleza, permite medidas absolutas de cantidad de sustancia mediante el método de dilución isotópica [23]. Esta técnica en conjunción con la espectrometría de masas con fuente de plasma (ICP-MS) constituye una herramienta imprescindible

la mínima dispersión respecto a los demás picos iónicos de la distribución isotópica.

dible para la detección y cuantificación de heteroátomos [24] que, como el fósforo, desempeñan un papel fundamental en la regulación de procesos biológicos. Por su relevancia, una descripción detallada de los protocolos de proteómica cuantitativa merece un capítulo aparte.

5. Resolución, precisión, exactitud y reproducibilidad

La capacidad de un espectrómetro de masas de distinguir entre las masas de dos picos adyacentes se expresa normalmente en términos de su resolución. Con una resolución adecuada, un espectrómetro de masas puede separar los picos (MH^+ , MH^++1 , MH^++2 ...) de una distribución isotópica (Fig.2).

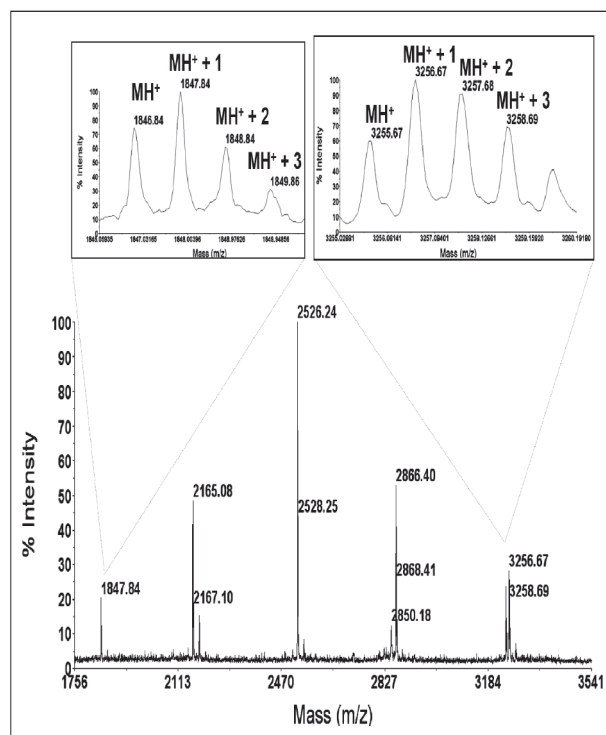


Figura 2. Espectro de masas de una mezcla de péptidos obtenido con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo reflectrón. Se muestran las distribuciones isotópicas de los iones monocargados de m/z 1846,48 y 3255,67. MH^+ , MH^++1 , MH^++2 , y MH^++3 corresponden, respectivamente, a los picos monoisotópicos, del primer isótopo (también denominado del ^{13}C), del segundo isótopo, y del tercer isótopo.

La resolución (R) se define como $M/\Delta M$. ΔM es la diferencia entre las masas de dos picos adyacentes que están resueltos y M corresponde a la masa sin decimales del primer pico. Dos picos próximos se consideran resueltos cuando la altura del valle entre

ellos no sobrepasa un determinado porcentaje, que debe ser especificado, de la altura media de ambos. Así, utilizando esta definición de la resolución, un espectrómetro capaz de resolver picos que tengan valores de m/z de 400,0 y 400,1 debería tener una $R \geq 4000$. El valor de la resolución calculada de esta manera varía para diferentes rangos de masa del mismo espectro: en el espectro de la Fig.2, $R = 1846$ para m/z 1846 pero 3255 para m/z 3255. Por ello, prefiere definirse ΔM como el incremento de m/z a una determinada altura (comunmente 50%) del pico M . En la literatura en lengua inglesa, el término estándar para este valor es “FWHM” (*full width at half mass*). Esta manera de calcular R proporciona valores esencialmente constantes en todo el rango de m/z . El espectro de la Fig.2 fue adquirido con una resolución de ~ 9000 , suficiente para resolver la distribución isotópica de los iones resaltados ($R = 1846/0,2 = 9230$; $R = 3255/0,36 = 9041$). En el ejemplo de la Fig.3, la resolución obtenida en el espectro del panel A fue $665,3/0,24 = 2.772$, casi en el límite del valor requerido para separar los picos isotópicos de este ión doblemente cargado. Esta misma resolución fue insuficiente para resolver adecuadamente (a 50% de la altura) los picos isotópicos del ión triplemente cargado m/z 898 (panel B).

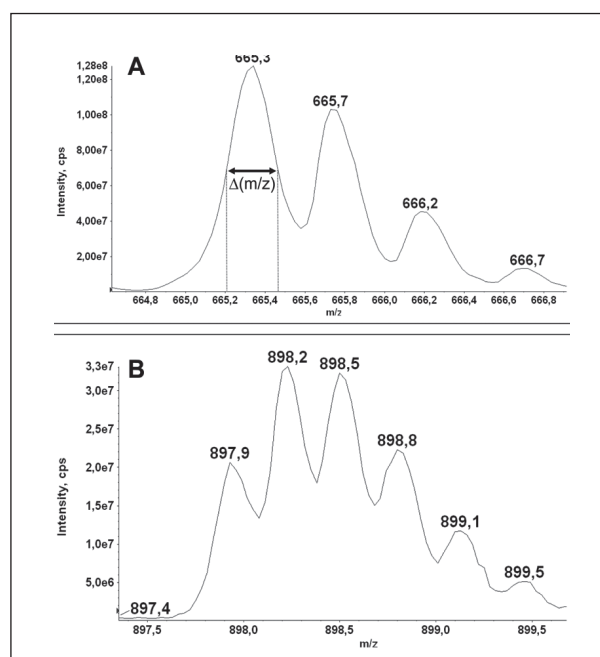


Figura 3. Espectro de resolución de los iones m/z 665,3 y 897,9 obtenidos mediante ionización por electrospray en un espectrómetro QTrap2000 (Applied Biosystems). La diferencia de 0,5 Th (A) y 0,3 Th (B) entre los picos de la distribución isotópica indica que los iones corresponden a $(M+2H)^{2+}$ (dicargado) y $(M+3H)^{3+}$ (tricargado), respectivamente, y sus masas moleculares son pues: $(665,3 \times 2) - (2 \times 1,007825) = 1328,58$ Da y $(897,9 \times 3) - (3 \times 1,007825) = 2260,67$ Da.

Para lograr resolución isotópica los centroides de los iones de la distribución deben estar separados, a mitad altura, por un $\Delta(m/z) \geq 1/2z$. Los analizadores de masas más comúnmente utilizados en Proteómica (de tiempo de vuelo -TOF-, de transformada de Fourier -FT-, triple cuadrupolos, trampas iónicas, Orbitraps, etc.) alcanzan resoluciones > 10.000 , pudiendo llegar en el caso del Orbitrap a superar 100.000 y alcanzar $> 2.000.000$ en el de los analizadores de transformada de Fourier (FTMS) [25]. No hay que confundir resolución, que es una característica propia de cada tipo de espectrómetro de masas, con precisión o con exactitud. La precisión se refiere a lo cerca que están unas de otras un conjunto de mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones. Esta cualidad debe evaluarse a corto plazo y tampoco debe confundirse con reproducibilidad (capacidad de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones experimentales a lo largo de periodos dilatados de tiempo). La precisión se expresa como una indicación del error máximo estimado para la magnitud. Es, pues, es una medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio. Así, la media de las medidas de m/z {479,220; 479,229; 479,218; 479,227} de un ión de fórmula $C_{18}H_{33}N_5O_{10}$ (masa exacta: 479,2230 Da) es un valor muy exacto (479,2235) pero poco preciso ($\pm 0,06$); en cambio el conjunto de medidas {482,220; 482,221; 482,220; 482,219} corresponde a un valor medio muy preciso ($\pm 0,01$) pero poco exacto. Quizás los términos más utilizados para cuantificar el error experimental son la *desviación estándar* o *desviación típica* (σ) [26], incorporado a la estadística por Karl Pearson en 1894 y definido actualmente como la raíz cuadrada de la varianza (la media de las diferencias con la media elevadas al cuadrado [27]), y la *desviación media* (media de las diferencias en valor absoluto de los valores a la media). Así, la desviación estándar de los valores de m/z 1235,456, 1235,458, 1235,452 y 1235,454 obtenidos de mediciones repetidas para el mismo ión es ± 0.0022 Th, y la desviación media es $\pm 0,002$ Th, sobre un valor promedio de 1235,455 Th.

La exactitud es una estimación de la cercanía entre el valor real y el valor medido. En espectrometría de masas representa la proximidad del valor de m/z registrado experimentalmente (M_{medida}) a su valor calculado ($M_{calculada}$). La exactitud de una medición de masa se expresa mediante el error relativo, frecuentemente en partes por millón (ppm), que representa la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero en relación al valor experimental:

$$\text{ppm} = [(M_{calculada} - M_{medida})/M_{calculada}] \times 10^6$$

Así, la masa exacta calculada para el ión monoisotópico a m/z 1846,84 de la Figura 1 es 1846,836. La exactitud de la medida fue, por tanto, $(1846,84 - 1846,838)/1846,836 = 2,16 \times 10^{-6}$, o 2 ppm.

El poder resolutivo es una propiedad intrínseca de cada analizador de masas; la exactitud de una medida de masa depende, además del sistema de medida, de parámetros externos como la calibración del instrumento y de la intensidad (concentración) de los iones. Las medidas realizadas en un instrumento de alta resolución pero mal calibrado serán poco exactas pero muy precisas, y en general reproducibles al tratarse de un error sistemático, un sesgo que hace que todas las medidas estén desviadas en una cierta cantidad. Por otra parte, en el rango de masas altas (ej. proteínas medidas en un analizador de tiempo de vuelo como el ejemplo mostrado en las Figs.4 y 5), cuando la resolución es insuficiente para separar los iones de la distribución isotópica (como es el caso de los espectros de ionización por electrospray de proteínas mostrados en las Fig.6), la geometría de los picos espectrales de los iones depende en gran medida del número de espectros acumulados. Además, la geometría de un pico espectral está en función de la resolución del espectrómetro de masas, pudiendo modelarse como una mezcla entre doble exponencial y gaussiana a resoluciones > 4000 y como una sigmoide (o gaussiana) doble asimétrica a resoluciones < 1000 . Dado que se considera como medida promedio de la masa el valor de m/z en el centroide del pico, cualquier fluctuación que distorsione la geometría (Fig.5B) de un pico iónico afectará pues al cálculo ulterior de su masa.

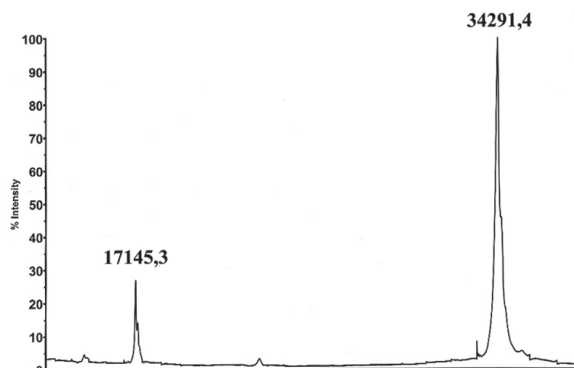


Figura 4. Panel superior, espectro de masas de una proteína obtenido con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal. El ión a m/z 34.291,4 puede teóricamente corresponder la especie quasimolecular $M+H^+$ o a un dímero $(2M+H)^+$ del ión a m/z 17.145,3.

6. Cálculo de la carga (z) y de la masa molecular monoisotópica

La distribución isotópica contiene las pistas necesarias para determinar la carga y la masa del correspondiente ión. Basta con aplicar consecuentemente la siguiente regla general para cualquier espectro de masas:

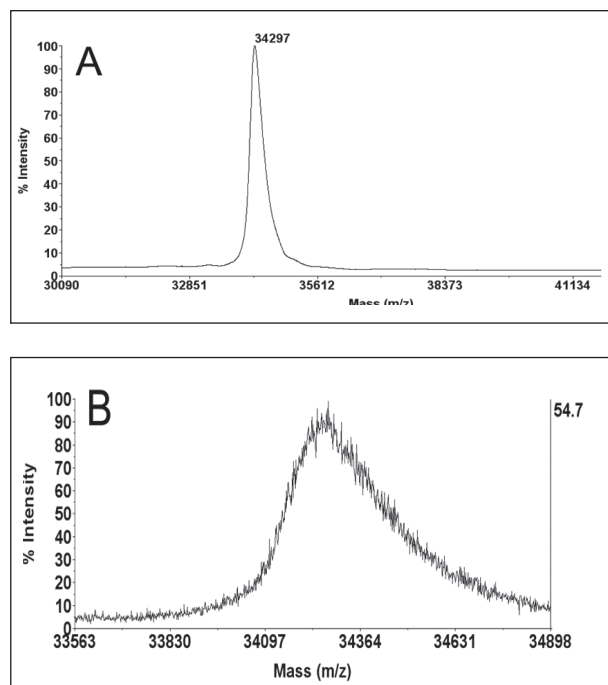


Figura 5. Panel A, espectro MALDI-TOF de una proteína de masa molecular 34,3 kDa obtenido en modo lineal. El panel B muestra un detalle del ápice del ión a m/z 34.297. La ampliación muestra el perfil en sierra de la envolvente del pico. El valor 34.297 es el calculado en el centroide del pico, pero la masa promedio exacta podría corresponder a cualquier valor incluido en 34.297 ± 35 Da.

Dado que la masa molecular de un ión cuasimolecular positivo se calcula mediante la fórmula $M = [(m/z) \times z] - zH^+$, donde zH^+ es el número de protones que el ión adquirió durante el proceso de ionización ($M \rightarrow M + zH^+$), la Regla 1 implica que el $\Delta(m/z)$ entre picos isotópicos vecinos es igual a $1/z$. En otras palabras: $z = 1/\Delta(m/z)$. En los ejemplos mostrados en la Fig.1 los iones a m/z 1847 y 3256 son ambos monocargados y sus masas cuasimoleculares (MH^+) monoisotópicas son 1845,84 y 3254,67 Th. Para iones con $z = 1$, 1 Th equivale a 1 Da, y por tanto las masas moleculares monoisotópicas de los iones de la Fig.1 son 1845, 83 y 3256,66 Da.

Regla 1: Los picos de la distribución isotópica de un ión monocargado son siempre consecutivamente mayores en una unidad de masa, comenzando por el ión monoisotópico.

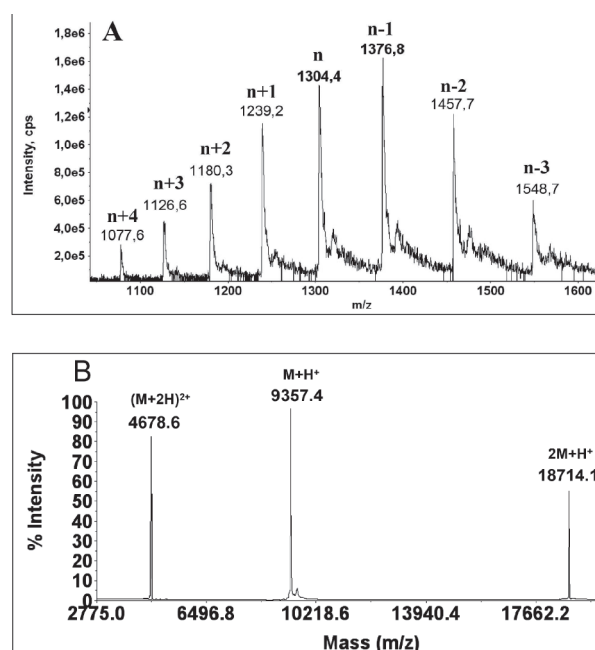


Figura 6. (A) Espectro de masas obtenido en un espectrómetro QTrap2000™ (Applied Biosystems) que muestra una serie de iones multicargados correspondiente a una proteína ionizada por electrospray. La carga “n” se ha asignado arbitrariamente al ión m/z 1304,4, quedando definidos los valores de carga de los demás iones del espectro. (B) Espectro de masas de una proteína obtenido con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal. La única solución coherente es que m/z 9357,4 sea el ión cuasimolecular $M+H^+$.

7. Determinación de z en espectros de masas moleculares promediadas

Cuando la resolución del analizador de masas no alcanza a resolver la distribución isotópica del ión la aproximación basada en la Regla 1 no es aplicable. En estas circunstancias el espectro de masas sólo muestra la envoltura de la distribución isotópica cuyo ápice corresponde al valor promediado por las abundancias relativas de los picos isotópicos (Fig.4). Esta masa se denomina masa molecular promedio (*isotope-averaged mass*, M_{av}). La M_{av} de un compuesto se calcula a partir de su fórmula química utilizando los valores de masas atómicas de la Tabla Periódica de los elementos. Retomando el ejemplo del glucagón ($C_{153}H_{224}N_{42}O_{50}S$), de masa molecular monoisotópica (M_{mono}) = $(153 \times 12,000) + (224 \times 1,007825) + (42 \times 14,00307) + (50 \times 15,99491) + 31,97207 = 3481,59931$ Da, tiene una masa molecular promedio igual a $(153 \times 12,0111) + (224 \times 1,00797) + (42 \times 14,0067) + (50 \times 15,9994) + 32,064 = 3483,7989$ Da. La diferencia entre M_{mono} y

M_{av} de moléculas como las biológicas formadas por los elementos C, H, N, O, S y P aumenta linealmente en función de su fórmula empírica de acuerdo a la ecuación:

$$M_{av} = M_{mono} + (0,0107C + 0,000075H + 0,00335N + 0,005030 O + 0,08793S)$$

Los espectros obtenidos mediante MALDI (*matrix-assisted laser-desorption ionization*) corresponden generalmente a iones monocargados (MH^+), pero la formación de iones doblemente cargados ($M+2H$)²⁺ y de aductos multiméricos del ión monocargado ($MH^+ + M \rightarrow (2M + H)^+$) no es infrecuente, particularmente en el caso de macromoléculas biológicas. El espectro de la Fig. 4 probablemente corresponda a una proteína de masa molecular promedio 34.290 Da, aunque la posibilidad de que la especie m/z 17.145,3 sea el ión quasimolecular MH^+ y el ión a m/z 34.291,4 corresponda a un dímero no puede formalmente descartarse. Para distinguir entre ambas posibilidades se necesita información adicional (ej. SDS-PAGE de la proteína) o aplicar un método para determinar la carga de los iones. Afortunadamente, para ello sólo tenemos que aplicar otra regla de cumplimiento obligatorio en espectros de moléculas multicargadas:

Regla 2: Los iones multicargados de una serie poseen cargas enteras consecutivas.

La Regla 2 implica que en una serie de iones multicargados no puede faltar ningún valor intermedio de z . Antes de volver al ejemplo de la Fig. 4, apliquemos esta regla al espectro de la Fig. 6A. Para ello asignamos carga “ n ” a cualquier ión de la serie, quedando entonces definida la carga de los iones consecutivos de menor masa como $n+1$, $n+2$, etc. y los de mayor m/z como $n-1$, $n-2$, etc. Si todos los iones del espectro pertenecen a una serie de iones multicargados de la misma molécula (en este caso una proteína) podemos plantear una ecuación para cada valor de m/z :

$$M = 1304,4 n - n$$

$$M = 1239,2 (n+1) - (n+1)$$

$$M = 1376,8 (n-1) - (n-1)$$

etc.

Igualando cualquier par de ecuaciones y despejando “ n ” obtenemos:

$$1304,4n - n = 1239,2n + 1239,2 - n - 1$$

$$(1304,4 - 1239,2)n = 1238,2$$

$n = 1238,2/65,2 = 18,99$ (= 19, pues la carga tiene que ser un número entero)

De forma general, $n = (M^{n+1}-1)/(M^n-M^{n+1})$, donde M^{n+1} y M^n corresponden a los valores de m/z de los iones a los que se asigna carga “ $n+1$ ” y “ n ”, respectivamente. Habiendo determinado la carga de cada ión de la serie, el cálculo de la masa molecular promedio de la proteína es inmediato:

$M = (1304,4 \times 19) - (19 \times 1,007825) = (1239,2 \times 20) - (20 \times 1,007825) = (1376,8 \times 18) - (18 \times 1,007825)$, etc., obteniéndose un valor de $24764,5 \pm 1$ Da. Existen, no obstante, programas sencillos que convolucionan los datos del espectro ESI en un espectro que muestra en un único pico la distribución de masa molecular promedio modelada matemáticamente para el ión monocargado.

La Regla 2 puede aplicarse a cualquier espectro con tres o más iones de una misma serie para determinar inequívocamente sus cargas. Por ejemplo, en el caso de MALDI, la presencia de un tercer pico en el espectro de la Fig. 6B garantiza la deducción de la masa molecular de la correspondiente proteína sin ambigüedades. En efecto, la única solución posible es que el ión m/z 9357,4 corresponda a la especie quasimolecular $M+H^+$ y, por tanto, m/z 4678,6 sea $(M + 2H)^{2+}$. Nótese que el ión m/z 18.714,1 no pertenece a la misma serie iónica que m/z 4678,6 y 9357,4, ya que ello implicaría una carga 0 para esta especie y recordemos que las partículas no cargadas son invisibles (materia oscura) para un espectrómetro de masas. m/z 18.714,1 sólo puede asignarse a un dímero monocargado $2M+H^+$. Cualquier otra solución es incongruente con la regla 2: si m/z 4678,6 fuera $M+H^+$, entonces m/z 9357,4 debería asignarse al dímero $2M+H^+$, lo cual no sería descabellado si no fuera porque en esta serie m/z 18.714,1 debiera corresponder al trímero $3M+H^+$, y claramente ese no es el caso. Igualmente, si m/z 18.714,1 fuera el ión quasimolecular, $M+H^+$, los iones m/z 9357,4 y m/z 4678,6 deberían asignarse a $(M+2H)^{2+}$ y $(M+3H)^{3+}$, siendo esta posibilidad nuevamente inconsistente con la Regla 2.

8. Polímeros versus series de iones multicargados.

En una serie de iones multicargados el $\Delta(m/z)$ entre iones consecutivos varía gradualmente, decre-

ciendo a medida que aumenta la carga. Esta característica puede utilizarse para distinguir el espectro de masas de una serie de iones multicargados y del de iones que no están relacionados entre sí por su carga. Así, los iones del espectro de la figura 7 están espaciados entre sí por un $\Delta(m/z)$ constante de aproximadamente 44 y están relacionados entre sí mediante la fórmula $m/z = [22.5 + 44(x+1)] + H^+$, siendo $x = 11$ para el ión de menor m/z . Este patrón de variación de m/z claramente indica que no puede tratarse de una serie de iones multicargados sino de una mezcla de polímeros monocargados compuestos por un número creciente de unidades de 44 Da (¿quizás bloques de CH_2-CHOH , una estructura común a muchos detergentes utilizados para solubilizar proteínas hidrofóbicas?).

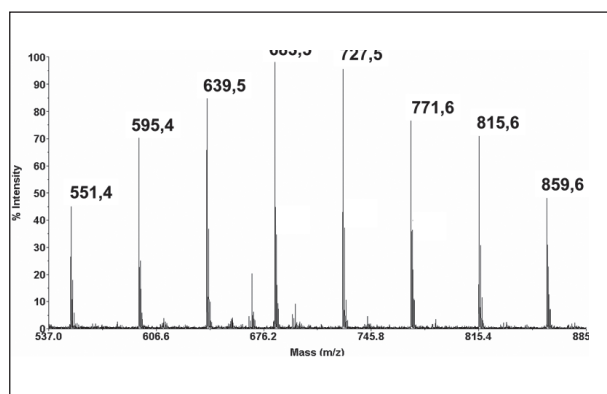


Figura 7. Espectro de masas de un polímero de fórmula $m/z = [22.5 + 44(x+1)] + H^+$ resuelto en un espectrómetro MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal.

9. Espectros con más de una serie de iones. Regla de conservación de la topología.

Un espectro de masas puede contener más de una serie de iones, por ejemplo porque se trate de una mezcla de proteínas, como en el ejemplo de la Fig. 8A. La Regla 2 nos permite identificar sin ambigüedad cada una de las series coexistentes en un mismo espectro de masas con tal de plantear las ecuaciones adecuadas. El caso más simple es cuando las series iónicas están separadas (Fig.8A). En este supuesto el inicio de la segunda serie comienza con el primer ión para el que la masa calculada asumiendo que pertenece a la primera serie se desvía significativamente del valor promedio de la serie. Así, en el ejemplo mostrado en el espectro de la Fig.8A, es fácil demostrar que el ión m/z 1102,8 no puede pertenecer a la misma serie que los iones de

mayor m/z , pues para que así fuera debería tener carga 27 y su masa molecular calculada (29.748,6 Da) es significativamente diferente del valor $29.337,5 \pm 4$ Da calculado para la serie que incluye a los iones de m/z 1129,1 a 1629,7. Además, si asignamos carga “n” a m/z 1129,1, la solución de la igualdad $M = 1129,1n - n = 1102,8(n+1) - (n+1)$ sería $n = 41,9$, que es un resultado absurdo. Por el contrario, los iones m/z 1102,8 (12+)-778,9 (17+) comprenden una serie que definen a una proteína de $13.222,3 \pm 2$ Da. Nuevamente, tanto la asignación de $z = 11$ al ión m/z 1129,1 ($M_{\text{calc}} = 12.409,1$ Da), como el valor de $n = 42,8$ calculado a partir de la ecuación $M = 1102,8n - n = 1129,1(n-1) - (n-1)$, son incongruentes con la hipótesis de que m/z 1102,8 pertenezca a la misma serie que los iones con carga +17 a +12.

Varias series de iones multicargados pueden también estar superpuestas en un mismo espectro. Cuando esto ocurre, y la masa molecular de las especies ionizadas es similar, la topología de cada grupo de iones se repite en cada rango de m/z . Esta regla de “conservación de la topología” se ilustra en el espectro del panel B de la Fig.8, que corresponde a una mezcla de isoformas de una proteína de ~7.3 kDa, y simplifica enormemente la identificación de los iones pertenecientes a cada serie. La Regla 3 se cumple aunque los iones de las diferentes series, agrupados por la superposición, difieran en su estado de carga (Fig.8C). Sin embargo, cuando las masas moleculares de las proteínas de la mezcla son muy diferentes la distribución de iones en el espectro no sigue la regla de conservación de la topología. El espectro de la figura 8D ilustra este punto. Ello es debido a que, de acuerdo a la Regla 2, en el rango de m/z 1000-1600, la serie teóricamente observable de la proteína de 13.783 Da abarca 5 iones, con $z = M/(m/z)$, mientras que en el mismo intervalo de medida las proteínas de masas moleculares 9001 Da y 4793 Da sólo pueden producir un máximo de 4 y 2 iones, respectivamente. No obstante, el número de iones producidos en la ionización por electrospray depende del número de protones captados (en modo positivo) o cedidos (en modo negativo) por el analito. En el caso de péptidos y proteínas, el extremo N-terminal y los residuos de histidina, arginina y lisina son los sitios que pueden protonarse a pH ácido.

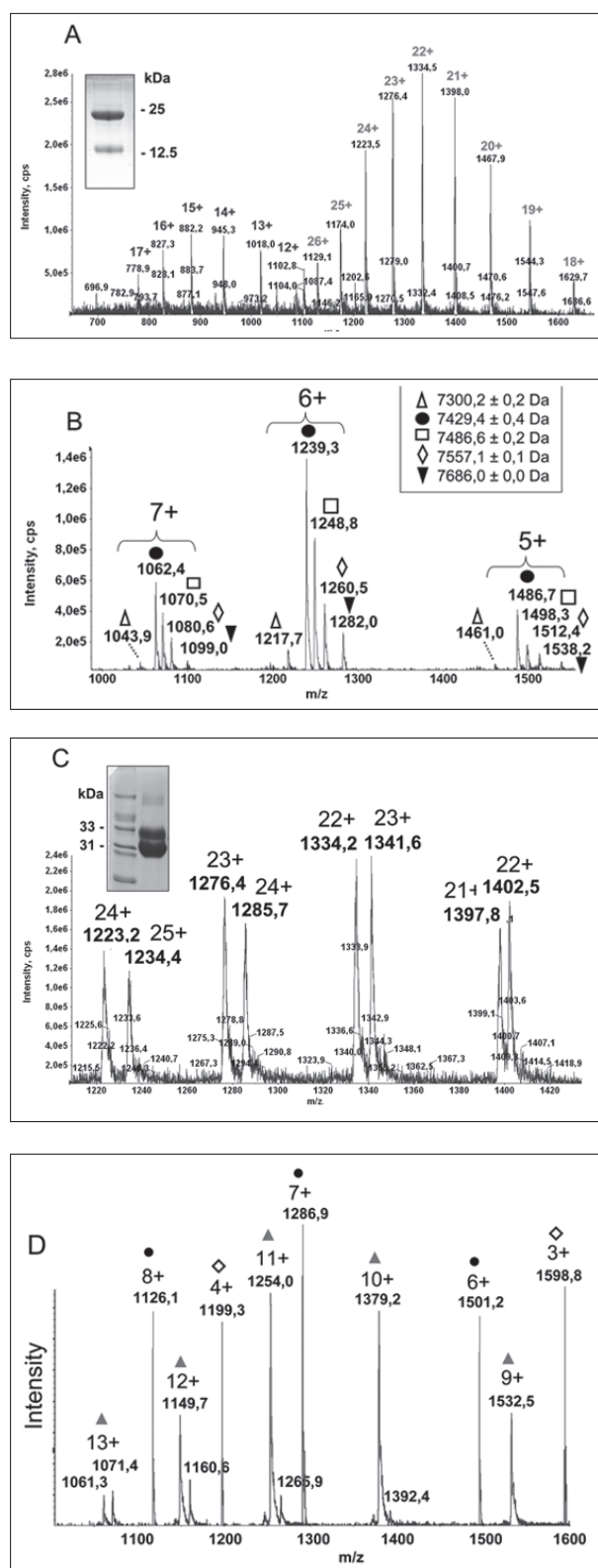


Figura 8. (A) Espectro de masas de una mezcla de dos proteínas. Las series de iones cargados con $z = 26+$ a $18+$ y con $z = 17+$ a $12+$ corresponden a toxinas aisladas de venenos de serpientes, CRISP (cysteine-rich secretory protein) cuya masa molecular promedio es $29.337,5 \pm 4$ Da y una fosfolipasa A_2 de masa molecular $13.222,3 \pm 2$ Da. (B) Espectro de masas de una mezcla de isoformas de la disintegrina barbourina aislada del veneno de *Sistrurus miliarius*

barbouri. La similitud topológica de los grupos de iones de cada rango de m/z facilita la asignación de las siguientes series de iones, que en el espectro están identificados con el mismo símbolo. (C) Detalle de un espectro de masas de una mezcla de las dos serinoproteasas de alrededor de 30 kDa analizadas en el gel de la izquierda. Las masas moleculares promedio calculadas son $29.332,8 \pm 1,1$ Da y $30.833,6 \pm 0,8$ Da. (D) Espectro de masas de una mezcla de toxinas de masas moleculares $13.783,2 \pm 1$ Da (PLA₂, serie 9+ a 13+), $9001,3 \pm 0,1$ Da (disintegrina bitistatina, serie 6+ a 8+) y $4793,3 \pm 0,1$ Da (miotoxina crotamina, iones de $z = 3+$ y $4+$). Los espectros de masas de los paneles A-D corresponden a proteínas ionizadas por electrospray y fueron obtenidos en un espectrómetro QTrap2000™ (Applied Biosystems).

Regla 3: La topología de los grupos de iones formados por la superposición de series de iones multicargados se repite a intervalos regulares de m/z

9. Algunos enlaces útiles

Muchos son los portales de Internet dedicados a aspectos relacionados con la espectrometría de masas y sus aplicaciones. Sería interminable citarlos todos, por lo que además de las páginas Web citadas anteriormente en el texto, he seleccionado los portales del Swiss Institute of Bioinformatics, (<http://us.expasy.org/tools>), del Institute for Systems Biology (<http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/index.html>) y de Thermo-Fisher Scientific (<http://www.ionsource.com>) por contener informaciones complementarias muy útiles sobre conceptos generales de espectrometría de masas, tablas de unidades y de masas atómicas y moleculares, calculadoras diversas y programas de conversión de datos, manuales para iniciarse en la interpretación de espectros, enlaces a otros portales de interés, etc. Espero que el lector interesado en la espectrometría de masas, especialmente en su vertiente biológica, disfrute navegando por estos hiperespacios.

Corolario

Arthur C. Clarke, el genial científico británico (1917-2008) que en 1945 sentó las bases de los satélites artificiales en órbita geostacionaria (llamada en su honor órbita Clarke), es quizás más conocido por sus famosas Leyes de Clarke. Publicadas en su libro de divulgación científica *Perfiles del Futuro* (1962), la más popular (y citada) de ellas es la llamada «Tercera Ley de Clarke»: *Toda tecnología lo suficientemente avanzada es indistinguible de la magia*. Y ¿acaso no es magia hacer volar elefan-

tes moleculares? La diferencia entre ilusionismo y espectrometría de masas es que los magos crean la ilusión de que hacen volar elefantes desafiando las leyes de la física y la lógica, en tanto que el espectrometrista aplica la lógica de los principios físicos para hacer volar elefantes y deducir sus propiedades específicas, vetadas a nuestros sentidos, únicamente observando su vuelo. La magia de la espectrometría de masas reside en que ello es posible con solo aplicar un par de reglas generales y matemáticas elementales...

Bibliografía citada

- [1] Thomson, J.J. (1906) Carriers of negative electricity. Nobel Lecture. http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1906/thomson-lecture.html
- [2] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1922/aston-lecture.pdf
- [3] <http://masspec.scripps.edu/mshistory/mshistory.php>
- [4] Cooks, R. G., Rockwood, A.L. (1991) The 'Thomson'. A suggested unit for mass spectroscopists. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, 93.
- [5] Weast, R.C. (1974) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- [6] Fenn, J.B. (2003) Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3871-3894.
- [7] Tanaka, K. (2003) The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3861-3870.
- [8] Hillenkamp, F., Peter-Katalinić, J. (2007) MALDI-MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications. Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 978-3-527-31440-9.
- [9] Watson, J.T., Sparkman, O.D. (2007) *Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation* (4th Edition), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, ISBN 978-0-470-51634-8.
- [10] Burbidge, E.M., Burbidge, G.R., Fowler, W.A. & Hoyle, F. (1957) Synthesis of the Elements in Stars. *Rev. Mod. Phys.* 29, 547-650.
- [11] Weinberg, S. *Los tres primeros minutos del universo*. Alianza Editorial, 1ª Ed. 1978. ISBN 84-206-2216-8.
- [12] Bethe, H.A. (1938) Energy production in stars. *Phys. Rev.* 55, 434 - 456.
- [13] Coplen, T.B. (2001) *Atomic Weights of the Elements 1999*, *Pure Appl. Chem.* 73, 667-683. (<http://physics.nist.gov/PhysRefData/Compositions/index.html>).
- [14] Gross, J.H. (2004) *Mass Spectrometry*. Springer-Verlag, Berlin, ISBN 3-540-40739-1
- [15] Kubinyi, H. (1991) Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem. *Anal. Chim. Acta* 247, 107-119.
- [16] Pappin, D.J., Højrup, P., Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3, 327-332.
- [17] Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5011-5015.
- [18] Mann, M., Højrup, P., Roepstorff, P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol. Mass Spectrom.* 22, 338-345.
- [19] James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet, G. (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 58-64.
- [20] Yates, J.R., Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal. Biochem.* 214, 397-408.
- [21] Ong, S.E., Mann, M. (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chem. Biol.* 1, 252-262.
- [22] Pan, S., Aebersold, R., Chen, R., Rush, J., Goodlett, D.R., McIntosh, M.W., Zhang, J., Brentnall, T.A. (2009) Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J. Proteome Res.* 8, 787-797.
- [23] Brun, V., Masselon, C., Garin, J., Dupuis, A. (2009) Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J. Proteomics* 72, 740-749.
- [24] Bettmer, J., Montes-Bayón, M., Encinar, J.R., Fernández-Sánchez, M.L., Fernández de la Campa, M. R., Sanz-Medel, A. (2009) The

- emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *J. Proteomics* 72, 989-1005.
- [25] Gelpí, E. (2009) From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part II 1985–2000. *J. Mass Spectrom.* 44, 1137-1161.
- [26] <http://www.disfrutalasmaticas.com/datos/desviacion-estandar-calculadora.html>
- [27] <http://www.disfrutalasmaticas.com/datos/desviacion-estandar.html>